

**ПОРІВНЯННЯ МАКРО- ТА МІКРОСКОПІЧНИХ ЗМІН ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ВІДТВОРЕННЯМ ФІБРОЗУ ЛЕГЕНЬ ЗА РІЗНИХ ВАРІАНТІВ КОРЕГУЮЧОГО ЛІКУВАННЯ**

**Вищий державний навчальний заклад України**

**«Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)**

Робота є фрагментом науково-дослідної теми: «Клініко-функціональні та морфологічні особливості перебігу захворювань респіраторної системи (туберкульозу, саркоїдозу, дисемінованих процесів та ХНЗЛ) на різних етапах лікування, реабілітації та профілактики», номер держреєстрації 0110U008151.

**Вступ.** Швидкість перебігу запалення у легеневій тканині, а також недостатня ефективність медикаментозної терапії при ідіопатичному фіброзуючому альвеоліті (ІФА), обумовлює тяжкість даної патології [3, 4, 5, 9], та спонукає до більш глибокого вивчення даного захворювання і пошуку нових методів лікування.

Ушкодження при ІФА стосуються не тільки власне інтерстицію, а також і альвеол, структури периферичних повітроносних шляхів, судин, які розташовані вздовж залучених до патологічного процесу базальних мембран [5, 9].

Для більш детального вивчення перебігу ІФА користуються експериментальним моделюванням фіброзу легень на щурах, використовуючи при цьому внутрішньолегеву інстиляцію блеоміцину [6, 11, 21]. Залежно від тривалості експерименту в легенях експериментальних тварин відбувається поетапна трансформація легеневої тканини, яка розпочинається (1-й день) набряком, інфільтрацією лейкоцитами межальвеолярних перетинок, альтерацією пневмоцитів I та II типу, і вже на 60-й день супроводжується наявністю розповсюджених зон сполучної тканини, ділянок перерозтягнення та емфіземи [6].

На нашу думку, застосування препаратів з відомими протизапальними та антифібротичними властивостями, а саме: глюкозаміну сульфату [10, 16, 17], дексаметазону [13, 14, 18] і комбінації імунофану [15, 23] та гіалуронідази [12, 19, 20] дозволить прослідкувати їхні можливі протективні властивості щодо динаміки макро- та мікроскопічних змін легеневої тканини піддослідних тварин з ініційованою моделлю фіброзу легень.

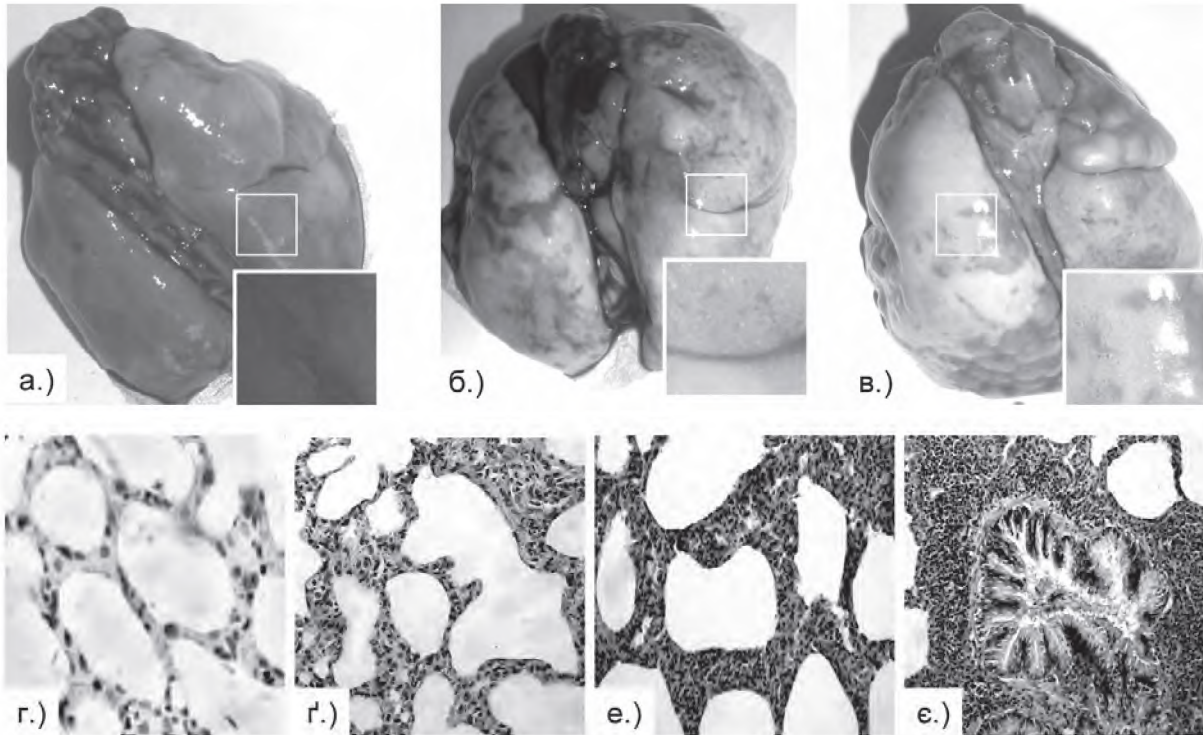
**Мета роботи.** Дослідити динаміку макро- та мікроскопічних змін у легенях щурів з експериментальним моделюванням фіброзу легень на фоні застосування препаратів з протизапальними та антифібротичними властивостями.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження виконано на базі ЕКБ віварій Вищого державного навчального закладу України «Українська медична

стоматологічна академія». Вся експериментальна частина дослідження, з використанням тварин, проведена згідно дотримання міжнародних принципів Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілях» (Страсбург, 1985) та норм біомедичної етики, відповідно Законам України № 3446-IV 21. 02. 2006 р., м. Київ, «Про захист тварин від жорстокого поводження» з проведенням медико-біологічних досліджень, та етичного кодексу лікаря України та вченого. Моделювання фіброзу легень (ФЛ) проведено з урахуванням рекомендацій загальноприйнятих методик [2].

Тривалість експерименту склала – 8 тижнів. З метою відтворення ФЛ тваринам (щурам) трансторакально за допомогою шприцу інстилювали в легені 0,3мл розчину гідрохлориду блеоміцину з розрахунку 1,0 мг/100 г маси тіла.

У дослідження включено 72 статевозрілих щурів лінії Вістар масою 258,7 (227,0; 280,0) грамів та віком 7,1 (6,6; 7,8) місяці. З 48 щурів сформували чотири дослідницькі групи по 12 особин в кожній. Одна група щурів, у яких моделювали ФЛ, знаходилась без лікування. Інші дослідницькі групи тварин з експериментальною патологією розподілені з урахуванням отриманого лікування – дексаметазон, глюкозаміну сульфат чи комбінація імунофану та гіалуронідази. Контрольну групу склали 24 щури, яких розділили на 4 групи. У частини щурів контрольної групи не застосовували ніяких лікарських засобів. Ряд тварин без експериментальної патології, в залежності від групи, отримували один з перелічених варіантів лікування: дексаметазон, глюкозаміну сульфат, комбінація імунофану та гіалуронідази. Режим введення та додавання препаратів: дексаметазон (KRKA, Словенія) по 0,08 мг/кг, в/м, через 2 дні; глюкозаміну сульфат (Дона (Rottapharm Ltd. » та «Sigmar S. r. l. » для «Rottapharm S. r. l. », Ірландія/Італія)) по 5,33 мг/кг, в/м, через 2 дні; комбінація імунофану (Біонокс (Росія Москва)) по 0,67 мг/кг, в/м та гіалуронідази (Лідаза-Біофарма, ЗАТ (Україна, Київ)) по 0,85 Од/кг в/м, через 2 дні. Всі вищевказані лікарські препарати на момент їх використання у дослідженні мали державну реєстрацію та повний пакет дозвільних документів відповідно до чинного законодавства України. Тривалість лікування склала від 8 до 16 тижнів в окремих групах. Щурам



**Рис. 1.** Характеристика макро- (б. гіперінфляція; в. емфізематозні булі) та мікроскопічних (г. емфізема; е. запальні зміни в інтерстиції легень; е. запальні зміни у бронхах) змін у легенях щурів з експериментальною моделлю фіброзу легень порівняно зі станом легень тварин контрольної групи (а.; г.). Фарбування гматоксиліном та еозином. Зб. х200.

проведено комплексне клініко-лабораторне, морфологічне, макроскопічне обстеження. Вилучені від експериментальних тварин тканини підлягали підготовці до світлової мікроскопії за загальноприйнятою методикою [7]. Препарати фарбували за допомогою гематоксиліну та еозину. Аналіз макро- та мікроскопічних змін легень щурів проводили на 4-му та 8-му тижнях.

Порівняння отриманих показників проводилось у пакеті прикладних програм Statistica та Epi Info (TM) 3. 5. 3 (CDC, 17. 07. 2008) [1, 8]. Відмінності вважались статистично достовірними при  $p \leq 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Досліджуючи стан легеневої тканини у щурів з експериментальною патологією, були враховані найбільш характерні для фіброзуючого альвеоліту макро- та мікроскопічні зміни [6, 21] (**рис. 1**).

У щурів з експериментальною моделлю ФЛ закономірно превалювали ураження тканини альвеолярної стінки легень.

Для якісного порівняння, перш за все, досліджено стан легень щурів з груп контролю (**рис. 2**).

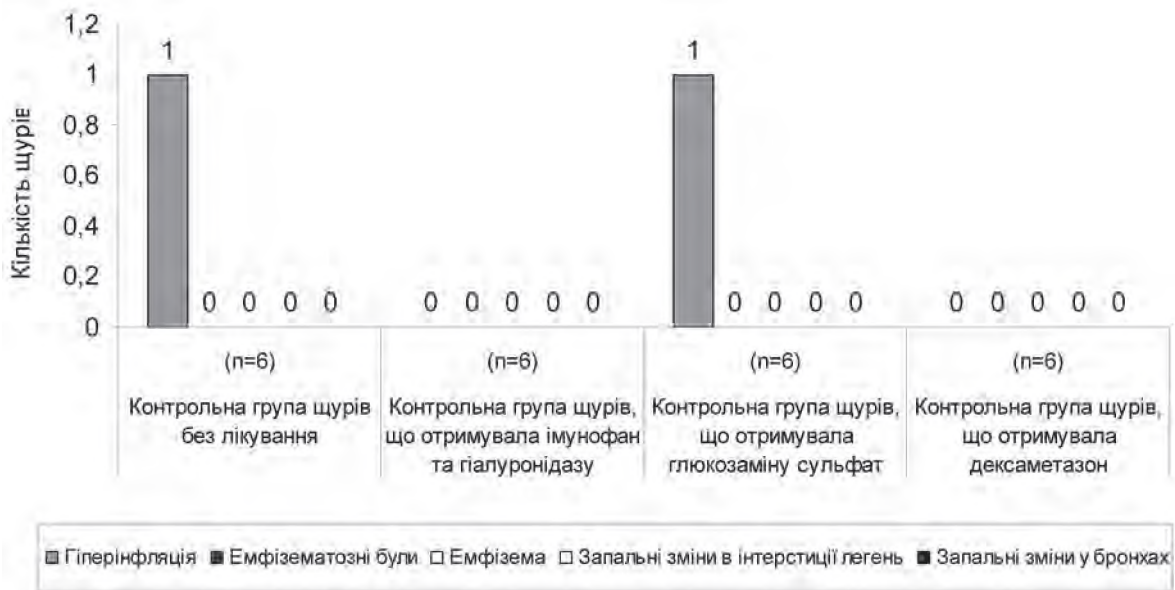
У тварин контрольної групи аномального рівня макро- та мікроскопічних змін не спостерігалось (**рис. 2**). Групи між собою статистичних відмінностей не мали. Отже, отримані результати дають можливість говорити про високий профіль безпечності використаних лікарських препаратів по відношенню до легеневої тканини та дозволяють використовувати ці дані в якості "еталону норми" при порівнянні з тваринами, у яких штучно викликали ФЛ.

Вивчаючи динаміку морфологічних змін у легенях тварин з ФЛ, було проведено оцінку їх зміни в залежності від отриманого лікування (**рис. 3**).

Оцінюючи результати зведеного патоморфологічного аналізу, було зафіксовано, що найбільший рівень ушкодження легеневої тканини спостерігався у щурів без лікування, порівняно з інтактними тваринами контрольної групи (**рис. 3**). Варто зазначити, що вірогідних відмінностей за макро- та мікроскопічними змінами у легенях при порівнянні між групами щурів, які отримували лікування, не відмічено. Серед щурів з моделлю ФЛ, що отримували дексаметазон протягом 8 тижнів, виявили найменшу кількість тварин з наявністю підвищеної повітряності легеневої тканини (гіперінфляції) і запальних змін в інтерстиції легень (**рис. 3**). Враховуючи результати експерименту, окрім підтвердження даних про протизапальні та антифібротичні властивості дексаметазону, у тварин з блеоміцин-індукованим фіброзом легень [22], також можна говорити і про певні протективні властивості дексаметазону стосовно легеневої тканини у щурів з експериментальним ФЛ, але за умови раннього і тривалого використання.

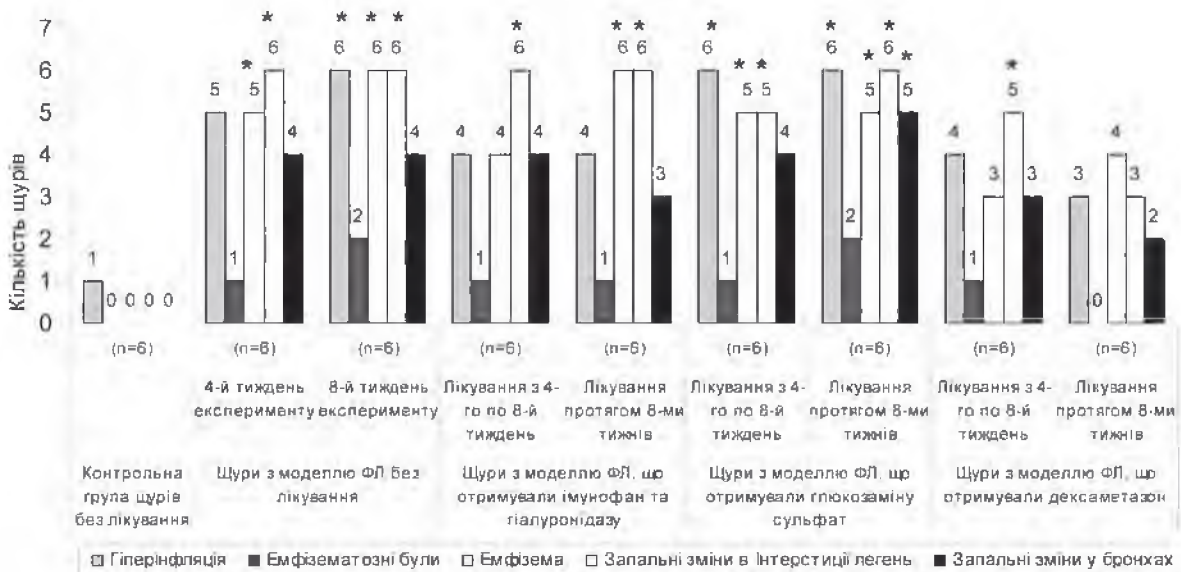
Отже, із усіх застосованих варіантів лікування (дексаметазон, глюкозаміну сульфат, комбінація імунофану та гіалуронідазу) дексаметазон виявився найбільш ефективним, а його 8-ти тижневе використання асоціювалося з найкращими протективними властивостями по відношенню до легеневої тканини. Проте швидкість перебігу запалення при штучно спровокованому фіброзі легень є такою, що

## ПАТОМОРФОЛОГІЯ



**Рис. 2. Порівняння морфологічних змін у щурів з груп контролю.**

**Примітка:** 1. \* –  $p < 0,05$  при порівнянні з контрольною групою щурів без лікування; 2. † –  $p < 0,05$  при порівнянні груп щурів, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію імунофану з гіалуронідазою, із групою, де застосовували дексаметазон; 3. # –  $p < 0,05$  при порівнянні груп щурів, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію імунофану з гіалуронідазою.



**Рис. 3. Співставлення макро- та мікроскопічних змін в легенях щурів з експериментальним моделюванням фіброзу легень (ФЛ) в залежності від отримуваного лікування порівню з контрольною групою.**

**Примітка:** 1. \* –  $p < 0,05$  при порівнянні з контрольною групою щурів без лікування; † –  $p < 0,05$  при порівнянні між групами щурів з моделлю ФЛ без лікування на 4-му та на 8-му тижні експерименту; 2. † –  $p < 0,05$  при порівнянні з групою щурів з моделлю ФЛ без лікування на 4-му тижні експерименту; 3. ‡ –  $p < 0,05$  при порівнянні з групою щурів з моделлю ФЛ без лікування на 8-му тижні експерименту; 4. – при порівнянні груп щурів з моделлю ФЛ, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію імунофану з гіалуронідазою з групою, де застосовували дексаметазон під час лікування з 4-го по 8-й тиждень експерименту; 5. § – при порівнянні груп щурів з моделлю ФЛ, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію імунофану з гіалуронідазою, з групою, де застосовували дексаметазон під час лікування протягом 8-ми тижнів експерименту; 6. # –  $p < 0,05$  при порівнянні між групами щурів з моделлю ФЛ, які отримували глюкозаміну сульфат та комбінацію імунофану з гіалуронідазою, під час лікування з 4-го по 8-й тиждень експерименту; 7. † –  $p < 0,05$  при порівнянні між групами щурів з моделлю ФЛ, які отримували глюкозаміну сульфат і комбінацію імунофану з гіалуронідазою під час лікування протягом 8-ми тижнів експерименту; 8. † –  $p < 0,05$  при порівнянні між групами щурів з моделлю ФЛ, що отримували медикаментозну корекцію з 4-го по 8-й тиждень та протягом 8-ми тижнів експерименту.

дозволяє лише частково його контролювати і супроводжується виникненням ускладнень з боку системи органів дихання.

**Висновки.** У щурів з експериментальною моделлю фіброзу легень найчастішою макроскопічною ознакою була підвищена повітряність легеневої тканини (гіперінфляція), а мікроскопічно превалювала емфізема та наявність запальних змін в інтерстиції легень.

Використання дексаметазону протягом 8-ми тижнів супроводжувалось найнижчим рівнем гіперінфляції та запальних змін у інтерстиції легень щурів з

блеоміцин-індукованим фіброзом легень, порівняно з тваринами, що отримувалим глюкозаміну сульфат чи комбінацію імунофану та гіалуронідази.

Швидкість перебігу патологічного процесу у щурів з експериментальною моделлю фіброзу легень є такою, що дозволяє лише частково його контролювати та супроводжується виникненням ускладнень з боку системи органів дихання.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальшому планується вивчити вплив глюкокортикостероїдів на обмін сполучної тканини при експериментальному моделюванні фіброзу легень.

### Список літератури

1. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / А. Банержи; [пер. с англ. под ред. В. П. Леонова]. – М.: Практическая медицина, 2007. – 287 С.
2. Данилов Л. Н. Моделирование заболеваний легких (Пособие для научных работников) / Л. Н. Данилов, Е. С. Лебедева, Ю. А. Кирилов. – СПб: НИИ пульмонологии, 2005 – 31 с
3. Интерстициальные болезни легких: Практическое руководство / [Коган Е. А., Корнев Б. М., Попова Е. Н. и др.]; под ред. Н. А. Мухина. – М.: Литература, 2007. – 432 С.
4. Интерстициальные заболевания легких: руководство для врачей / [Агишев А. С., Акопов А. Л., Амосов В. И. и др.]; под ред. М. М. Ильковича, А. Н. Кокосова. – СПб: Нормиздат, 2005. – 560 С.
5. Ідіопатичні інтерстиціальні пневмонії: класифікація, діагностика, лікування: Методичний посібник / Ю. І. Феценко, В. К. Гаврисюк, С. І. Лещенко [та ін.]. – К.: ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України», ДНМУ ім. М. Горького. – 2008. – 31 С.
6. Моделирование заболеваний легких (Пособие для научных работников) / Л. Н. Данилов, Е. С. Лебедева, Ю. А. Кирилов СПб: НИИ пульмонологии, 2005. – 31 С.
7. Морфологічні зміни серця старих щурів при тривалому введенні активаторів КАТФ-каналів (діазоксиду та його аналогів) К. В. Тарасова, В. Г. Шевчук, О. В. Григорук [та ін.] // Пробл. старения и долголетия. – 2011. – Том. 20. – № 4. – С. 381-392.
8. Халфарян А. А. STATISTICA 6. Математическая статистика с элементами теории вероятностей: Учебник / А. А. Халфарян. – М.: Издательство Бином, 2010. – 496 С.
9. American Thoracic Society / European Respiratory Society. Internal Multidisciplinary Consensus on the Idiopathic Interstitial Pneumonias [Текст] // Am. J. ResP. Crit. Care Med. – 2002. – Vol. 165. – P. 277-304.
10. Anti-inflammatory action of sulfated glucosamine on cytokine regulation in LPS-activated PMA-differentiated THP-1 macrophages / J. A. Kim, B. N. Ahn, C. S. Kong [etal.] // Inflamm. Res. – 2011. – Vol. 60(12). – P. 1131-1138.
11. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of sirolimus on bleomycin-induced pulmonary fibrosis / B. Tulek, E. Kiyani, H. Toy [etal.] // Clin. Invest. Med. – 2011. – Vol. 34(6). – P. 341.
12. Cytokine regulation of human lung fibroblast hyaluronan (hyaluronic acid) production. Evidence for cytokine-regulated hyaluronan (hyaluronic acid) degradation and human lung fibroblast-derived hyaluronidase / P. M. Sampson, C. L. Rochester, B. Freundlich [etal.] // J. Clin. Invest. – 1992. – Vol. 90(4). – P. 1492-1503.
13. Dexamethasone blocks the systemic inflammation of alveolar hypoxia at several sites in the inflammation cascade / J. Chao, Z. Viets, P. Donham [etal.] // Ann. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2012. – Режим доступу: <http://ajpheart.physiology.org/content/early/2012/05/14/ajpheart.00106.2012.abstract>.
14. Dexamethasone pretreatment provides anti-inflammatory and myocardial protection in neonatal arterial switch operation / R. Heying, E. Wehage, K. Schumacher [etal.] // Ann. Thorac. Surg. – 2012. – Vol. 93(3). – P. 869-876.
15. Disturbance of immune status and cytokine profile caused by chronic intoxication with organophosphorus compounds and their correction by administration of imunofan / [No authors listed] // EksP. Klin. Farmakol. – 2012. – Vol. 75. – № 1. – P. 35-37.
16. Glucosamine improved atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice by inhibition of Th2 cell development / C. H. Kim, K. A. Cheong, C. D. Park [etal.] // Scand. J. Immunol. – 2011. – Vol. 73(6). – P. 536-545.
17. Glucosamine suppresses interleukin-8 production and ICAM-1 expression by TNF-alpha-stimulated human colonic epithelial HT-29 cells / S. Yomogida, J. Hua, K. Sakamoto [etal.] // Int. J. Mol. Med. – 2008. – Vol. 22(2). – P. 205-211.
18. Hill G. E. Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important? / G. E. Hill // J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. – 1998. – Vol. 12. – Suppl. 1. – P. 21-25.
19. Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells / M. E. Monzyn, D. Manzanares, N. Schmid, S. M. Casalino-Matsuda [etal.] // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. – 2008. – Vol. 39(3). – P. 289-295.
20. Lennon F. E. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in lung pathobiology / F. E. Lennon, P. A. Singleton // Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. – 2011. – Vol. 301(2). – P. 137-147.
21. Mouratis M. A. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin / M. A. Mouratis, V. Aidinis // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2011. – Vol. 17(5). – P. 355-361.
22. Short courses of low dose dexamethasone delay bleomycin-induced lung fibrosis in rat / F. Chen, L. Gong, L. Zhang, [etal.] // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – Vol. 536. – № 3. – P. 287-295.
23. Typical immune system responses to differential monotherapy with immune-correcting drugs / A. M. Zemsko, B. M. Zemskov, V. I. Zolodov [etal.] // Fiziol. Cheloveka. – 2001. – Vol. 27(4). – P. 97-103.

УДК 616. 24-002. 17-092. 9

### **ПОРІВНЯННЯ МАКРО- ТА МІКРОСКОПІЧНИХ ЗМІН ЛЕГЕНЬ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ВІДТВОРЕННЯМ ФІБРОЗУ ЛЕГЕНЬ ЗА РІЗНИХ ВАРІАНТІВ КОРЕГУЮЧОГО ЛІКУВАННЯ**

**Бойко Д. М., Бойко М. Г., Ніколенко Д. Є.**

**Резюме.** Метою роботи було дослідити динаміку макро- та мікроскопічних змін у легенях щурів з експериментальним моделюванням фіброзу легень (ФЛ) на фоні застосування препаратів з протизапальними та антифібротичними властивостями.

У дослідження включено 72 статевозрілих щури лінії Вістар. Контрольну групу склали 24 щури. Щурам проведено комплексне клініко-лабораторне, морфологічне, макроскопічне обстеження.

У щурів з моделлю ФЛ без лікування, порівняно з інтактними щурами контрольної групи, спостерігався найбільший рівень ушкодження легеневої тканини. Серед щурів з моделлю ФЛ, що отримували дексаметазон протягом 8 тижнів, виявили найменшу кількість тварин з наявністю підвищеної повітряності легеневої тканини (гіперінфляції) і запальних змін в інтерстиції легень.

Використання дексаметазону протягом 8-ми тижнів супроводжувалось найнижчим рівнем підвищеної повітряності легеневої тканини (гіперінфляції) та запальних змін у інтимі легень щурів з блеомицин-індукованим фіброзом легень, порівняно з тваринами, що отримували глюкозаміну сульфат чи комбінацію імунофану та гіалуронідази.

**Ключові слова:** фіброз легень, експеримент, щури.

УДК 616. 24-002. 17-092. 9

### **СРАВНЕНИЕ МАКРО- И МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛЕГКИХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕМ ФИБРОЗА ЛЕГКИХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ КОРРЕГИРУЮЩЕГО ЛЕЧЕНИЯ**

**Бойко Д. Н., Бойко Н. Г., Ніколенко Д. Є.**

**Резюме.** Целью работы явилось исследование динамики макро- и микроскопических изменений в легких крыс с экспериментальным моделированием фиброза легких (ФЛ) на фоне применения препаратов с противовоспалительными и антифибротическими свойствами.

В исследование включено 72 половозрелые крысы линии Вистар. Контрольную группу составили 24 крысы. Крысам проведено комплексное клинико-лабораторное, морфологическое, макроскопическое обследования.

У крыс с моделью ФЛ без лечения, по сравнению с интактными крысами контрольной группы, наблюдался наибольший уровень повреждения легочной ткани. Среди крыс с моделью ФЛ, получавших дексаметазон в течение 8 недель, обнаружили меньшее количество животных с наличием повышенной воздушности легочной ткани (гиперинфляции) и воспалительных изменений в интерстиции легких.

Использование дексаметазона в течение 8-ми недель сопровождалось наиболее низким уровнем повышенной воздушности легочной ткани (гиперинфляции) и воспалительных изменений в паренхиме легких крыс с блеомицин-индуцированным фиброзом легких, по сравнению с животными, получавшими глюкозамина сульфат или комбинацию иммунофана и гиалуронидазы.

**Ключевые слова:** фиброз легких, экспериментальная модель, крысы.

UDC 616. 24-002. 17-092. 9

### **Comparison Of Macro- And Microscopic Changes In Lungs Of Rats With Experimental Reproduction Of Pulmonary Fibrosis In Different Variants Of Corrective Treatment**

**Boyko D. M., Boyko M. G., Nikolenko D. E.**

**Summary.** To investigate the dynamics of the macro- and microscopic changes in lungs of rats with experimental modeling of pulmonary fibrosis (PF) during treatment by drugs with anti-inflammatory and antifibrotic properties.

The study included 72 sexually mature Wistar rats. The control group consisted of 24 rats. The rats carried out a comprehensive clinical and laboratory, morphological, macroscopic examination.

In rats with model of PF without the treatment, compared with intact rats of control group, observed the greatest level of damage to lung tissue. Among the rats with a model of the PF treated with dexamethasone for 8 weeks, found a smaller number of animals with the presence of increased airiness of lung tissue (hyperinflation) and inflammatory changes in lung interstitium.

The use of dexamethasone for 8 weeks followed by the lowest level of hyperinflation and inflammation in the lung parenchyma of rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis, compared with animals treated with glucosamine sulfate or a combination of hyaluronidase and immunofan.

**Key words:** pulmonary fibrosis, experimental model, rats.

Стаття надійшла 19. 06. 2012 р.

Рецензент – проф. Гасюк А. П.